

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.32.008

Neuronatin 对人视网膜色素上皮细胞增殖迁移的影响*

胡冉 李惠明[△] 王慧萍 韦芳 王丰 王荣花

(上海交通大学附属第一人民医院实验中心 上海 201620)

摘要 目的:研究胚胎时期表达部位广泛、丰度高,而成年后分化表达的印记基因 Neuronatin(Nnat)的两种剪接形式 Nnat α 和 Nnat β 对人视网膜色素上皮细胞(RPE)增殖、迁移的影响。**方法:**构建 Nnat α 、 β 两种剪接形式的表达质粒,转染 RPE 获得表达该基因的稳定表达细胞株;CCK-8 实验检测稳定表达细胞株的增殖能力,流式细胞仪分析细胞周期,细胞划痕实验检测其迁移能力。**结果:**成功构建了 Nnat α 和 Nnat β 表达质粒,并获得了 Nnat α 和 Nnat β 基因稳定表达 PRE 细胞株。CCK-8 实验结果显示 cNNAT α 组与对照组相比较,增值率为 23.33 % ($P < 0.05$),cNNAT β 组相较于对照组无显著性差异,细胞周期分析 cNNAT α 组和 cNNAT β 组细胞在 G2-S 期的百分率分别为 18.60 %、11.11 %,对照组的为 9.94 %;相较于对照组,cNNAT α 组的细胞迁移能力显著增强,cNNAT β 组的细胞迁移能力微弱增强。**结论:**Nnat α 对 RPE 有一定的增殖作用,其影响主要在 S 期;同时,Nnat α 显著促进 RPE 细胞的迁移能力。

关键词:Neuronatin(Nnat);人视网膜色素上皮细胞;细胞增殖;细胞迁移

中图分类号:R774;R-33;Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)32-6233-04

The Effect of Neuronatin on Proliferation and Migration in Human Retinal Pigment Epithelial Cells*

HU Ran, LI Hui-ming[△], WANG Hui-ping, WEI Fang, WANG Feng, WANG Rong-hua

(Experimental Central, First People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 201620, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of two splicing forms of Neuronatin (Nnat α and Nnat β), which are expressed widely and abundantly in the fetal period and differentially expressed mainly in the pituitary gland in the adulthood on the proliferation and migration in human retinal pigment epithelium (RPE) cellline. **Methods:** To construct two splicing forms (Nnat α and Nnat β) expressing plasmids and obtain stable RPE celllines after transfecting RPE cellline with the constructs containing the targeting gene; proliferation, cell cycle analysis and its ability to migrate were evaluated by CCK-8 assay, flow cytometry and cell wound scratch assay respectively. **Results:** Nnat α and Nnat β expressing plasmids were successfully constructed, Nnat α and Nnat β gene stable expressing RPE celllines were obtained. CCK-8 test results showed that pNNAT α increased cell proliferation by 23.33 % ($P < 0.05$) compared with the control pSNAV transfected cellline. Further analysis through flow cytometry revealed that the percentage of G2S-phase cells in the control pSNAV transfected cellline was 9.94 %, and in pNNAT α and pNNAT β stable celllines were 18.60% and 11.11% respectively. Compared with the control cellline, the migration of pNNAT α cellline was enhanced significantly, and the ability of migration of pNNAT β was enhanced weakly. **Conclusion:** NNAT α could enhance the proliferation of RPE cellline significantly and the influence mainly happened on S period and NNAT α could enhance the migration of RPE celllines significantly.

Key words: Neuronatin; Human retinal pigment epithelial cell; Cell proliferation; Cell migration

Chinese Library Classification (CLC): R744; R-33; Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)32-6233-04

前言

Neuronatin(Nnat)是 1996 年克隆的脑特异表达的父本来源的印记基因。人 Nnat 基因全长 3973 bp,含有 3 个外显子和 2 个内含子^[1]。Nnat mRNA 有两种剪接形式: α 和 β ,两者具有统一相位的开放阅读框,分别编码 81 个和 54 个氨基酸,其差别在于 β 形式的第二个外显子被剪切掉^[2]。Nnat 在发育成熟的组

织中,除了大脑或神经来源的细胞表达较强外,在中枢神经系统以外的组织中也有表达,主要分布在卵巢、肾上腺、肺、肌肉、胰脏^[3]。我们课题组发现其在视网膜中也表达,在胚胎期视网膜的全层表达,而在发育成熟的视网膜主要集中在节细胞层和 RPE 细胞表达,具有时间与空间上的特异性^[4]。近些年来,人们对 Nnat 的研究越来越广泛深入,在神经系统中,有报道表明 Nnat 可以通过上调胞内钙而使胚胎干细胞分化为神经组织^[5],在

* 基金项目:上海市自然科学基金项目(09ZR1425000);上海市自然科学基金项目(11ZR1429400)

作者简介:胡冉(1987-),女,硕士研究生,主要研究方向:肿瘤的临床基础研究

Δ 通讯作者:李惠明,电话:021-37798756, E-mail: lihuiming73@gmail.com

(收稿日期:2014-03-24 接受日期:2014-04-18)

大脑海马区神经元发育以及树突的可塑性中起着重要作用^[9]; Nnat 能通过上调胞内钙引起内质网应激而导致神经病变^[7]; 当坐骨神经横断伤后, 背根神经节中 Nnat 异常表达^[8]。在外周系统中, Nnat 目前已作为干细胞分化为胰腺细胞的标志物^[9], 并且已有研究证明了 Nnat 参与了胰腺的功能调节^[10-11]。少量研究表明该蛋白受代谢状态调节, 与肥胖有关联^[12-14]。此外有报道该蛋白参与了皮肤角质细胞的分化^[15], 在部分肿瘤组织中异常表达^[16-17]。但目前尚没有对其在视网膜组织中相关功能研究的报道。

视网膜色素上皮细胞(retinal pigment epithelium, RPE)在增殖性玻璃体视网膜病变(proliferative vitreoretinopathy, PVR)的发生和发展过程中起重要作用, 被认为是 PVR 膜形成和收缩的最主要的细胞。RPE 细胞的增殖、迁移、转化、细胞外基质分泌以及对细胞因子的刺激反应性增加等功能异常在其中起着重要的作用^[18], 但其发生发展的机理尚不完全清楚。Nnat 基因对于视网膜而言是一个我们新近发现基因, 其在发育成熟的视网膜的 RPE 细胞中表达丰度较高^[9], 提示我们进一步探索 Nnat 基因的功能有助于深入了解 PVR 发生发展的机理。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 主要试剂与仪器 限制性内切酶、T4 连接酶、高保真 Pfu 酶均购于 TaKaRa 公司, Lipofectamin 2000 转染试剂和 Trizol 购于 Invitrogen 公司, NNAT 单克隆抗体(兔抗人)购于 Abcam 公司, 二抗(羊抗兔)、内参 GAPDH 抗体(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)均购于上海康城生物公司, Reverse Transcription System (A3500)试剂盒购于 Promega 公司, SYBR@Green I (DRR041A)试剂盒购于 TaKaRa 公司, CCK-8 试剂购于上海碧云天公司, 流式细胞仪为 BD 公司产品, PCR 仪、凝胶成像仪(Universal Hood II)均为 Bio-Rad 公司产品。

1.1.2 细胞培养 人视网膜色素上皮细胞(RPE), 培养基为含 10%胎牛血清(四季青)的 DMEM/F-12 1:1 培养基。细胞置于 37℃, 5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养, 0.25%胰蛋白酶消化传代。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建 引物序列如下: 上游引物 5-ggggtaccatggcggcagtgccggcgccg-3, 下游引物 5-gaagatcttcagttggggctcgcctcct-3; 模板来源为人视网膜组织。获得的目的 PCR 片段长度理论上分别为 181 bp、262 bp。获得的目的片段通过双粘性末端连接克隆至腺相关病毒穿梭质粒 pSNAV (7015 bp), 共计 2 个质粒, 分别命名为 pNNAT α 、pNNAT β , 所获得的克隆经过测序确保无突变。

1.2.2 构建质粒的 PCR 鉴定 质粒构建后, 以构建质粒 DNA 为模板, 上游引物为: 5-ggggtaccatggcggcagtgccggcgccg-3, 下游引物为: 5-gaagatcttcagttggggctcgcctcct-3; 扩增条件为预变性 94℃, 2 min, 94℃, 30 s, 退火 54℃, 30 s, 70℃, 30 s, 30 个循环, 72℃, 5 min, 4℃保存。取 10 μ L PCR 扩增产物进行 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测产物。

1.2.3 构建质粒的 Western-Blotting 鉴定 在 6 孔板中接种 5 $\times$ 10⁵ 孔的 RPE 细胞, 用含 10%胎牛血清完全培养基, 置 5%

CO₂ 培养箱中 37℃ 培养过夜。待细胞长到 80%左右时, 在无菌条件下进行质粒转染。48 h 后收集细胞、抽提蛋白进行 Western-Blotting 鉴定。

1.2.4 质粒稳定表达细胞株的建立 在 6 孔板中接种 5 $\times$ 10⁵ 孔的 RPE 细胞, 置 37℃, 5%CO₂ 培养箱中培养过夜。在无菌条件下进行质粒转染, 转染的质粒为 pNNAT α 、pNNAT β 、pSNAV 和 pEGF-N1(荧光对照质粒)。培养 24 h 后, 加入终浓度为 500 μ g/mL G418, 继续培养; 48 h 后, 细胞消化以 1:2 传代到 6 mm 培养皿中, 继续培养, 每 3-5 天更换一次终浓度为 500 μ g/mL 的 G418 的培养基。培养至 14 天, 此时已有单个细胞群落形成。对已形成的细胞群落进行挑单克隆筛选, 剩余细胞继续培养。挑克隆鉴定筛选到高表达的阳性表达株, 用含 100 μ g/mL 的 G418 细胞培养基培养 2 代即可获得高表达的稳定表达细胞株 pNNAT α -RPE、pNNAT β -RPE、pSNAV-RPE 和 pGFP-N1-RPE, 以下简称 cNNAT α 、cNNAT β 、control 和 cGFP。

1.2.5 质粒的 Western-Blotting 鉴定及目的质粒稳定表达细胞株的鉴定 瞬时转染目的质粒 48 小时后, 收集 RPE 细胞, 裂解蛋白; 培养稳定表达细胞株 cNNAT α 、cNNAT β 、control、cGFP 及 RPE 细胞, 胰酶消化收集细胞沉淀, 加入 0.2 mL 裂解液和 2 μ L 蛋白酶抑制剂 PMSF, 裂解细胞收集蛋白, 利用 BAC 法测量蛋白浓度, 加蛋白变性缓冲液, 混匀后, 水浴 98℃ 变性 10 min。

根据待检测蛋白分子量的大小, 选择 15%的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶作为分离胶; 每泳道上样总蛋白量为 50 μ g; 电泳、转膜、一抗 4℃ 孵育过夜、二抗室温孵育 1.5 h、化学发光法分子成像(Bio Rad Universal Hood II)。

1.2.6 目的质粒稳定表达细胞株 RT-PCR 的鉴定 在 6 孔板中培养稳定表达细胞株 cNNAT α 、cNNAT β , 用 Trizol 法抽提细胞总 RNA, 按照逆转录试剂盒说明书步骤进行逆转录, 然后以 cDNA 为模板进行 Nnat 基因扩增, 上游引物 5-ggggtaccatggcggcagtgccggcgccg-3, 下游引物 5-gaagatcttcagttggggctcgcctcct-3, 扩增条件: 预变性 95℃, 2 min, 变性 94℃, 10 s, 退火 64℃, 30 s, 延伸 72℃, 20 s, 30 个循环, 4℃保存。取 10 μ L RT-PCR 扩增产物进行 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测产物。

1.2.7 流式细胞仪分析细胞周期 稳定表达细胞株 cNNAT α 、cNNAT β 、control 消化计数后, 以 5 $\times$ 10⁵ 孔种于 60 mm 培养皿中, 每组设 4 个复孔, 培养 48 h, 检测细胞周期。步骤如下: 胰酶消化细胞, 1000 $\times$ g 离心 5 min 后去上清; 加入 1 mL 预冷的 PBS 重悬细胞, 1000 $\times$ g 离心 5 min 后去上清; 加入 300 μ L 的预冷的 PBS 重悬细胞, 然后向细胞悬液缓慢滴加 700 μ L 提前在 -20℃ 预冷过夜的无水乙醇, 边滴加边混匀, 4℃固定 2 h 以上; 1000 $\times$ g 离心 5 min, 收集固定细胞, PBS 洗涤两次; 加入 0.5 mL PBS 重悬细胞, 加入 PI 和 RNaseA 至终浓度 50 μ g/mL, 37℃ 孵育 30 min; 用流式细胞仪测定细胞周期, 细胞计数不低于 5000 个。

1.2.8 细胞迁移实验 培养稳定表达细胞株 cNNAT α 、cNNAT β 、control, 胰酶消化计数后, 以 1 $\times$ 10⁶ 个/孔接种在 6 孔板, 在 37℃, 5% CO₂ 细胞培养箱培养过夜; 用 200 μ L 枪头比着直尺, 垂直平行的划 5 次, 间距在 0.5 cm 左右; 用 PBS 洗细胞 3 次, 去除划下的细胞, 加入含 2%胎牛血清的培养基; 放入

37 ℃、5 % CO₂ 培养箱,培养;按 0,18,36,48 小时取样,显微镜拍照记录。

1.2.9 细胞增殖实验 CCK-8 培养稳定表达细胞株 cNNAT α 、cNNAT β 、control,胰酶消化计数后,以 4×10^3 个 / 孔铺种于 96 孔板,每孔 100 μ L 培养基,每组细胞铺 4 个复孔。放置于细胞培养箱培养 48 h,用 CCK-8 试剂盒检测细胞活力。CCK-8 检测步骤:更换培养基;每孔加 10 μ L CCK-8 试剂后,培养箱培养 1 h 后,用酶标仪测定培养孔在 450 波长的吸光度。

1.3 统计学处理

用 SPSS16.0 统计学软件进行数据分析,采用单因素方差分析法检验三组细胞 CCK-8 数值与细胞划痕数值的组间差异。检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 质粒的鉴定

2.1.1 质粒的 PCR 鉴定 质粒 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图谱显示(图 1(A)),pNNAT α 条带大小在 200 bp-300 bp 之间,pNNAT β 条带大小在接近 200 bp 处,与理论值大小相符(pNNAT α 为 262 bp,pNNAT β 为 181 bp)。

2.1.2 质粒的 Western-Blotting 鉴定 质粒瞬时转染 RPE 细胞后,Western-Blotting 结果显示(图 1(B)),pNNAT α 组,pNNAT β 组蛋白条带位置与预计大小相符,为 10 kDa 左右,表明 pNNAT α 、pNNAT β 转染 RPE 细胞能高效表达 NNAT α 、NNAT β 蛋白,而 pSNAV 组与空白对照组 RPE 细胞在同一检测条件下均未检测到 NNAT 蛋白表达。结果不仅证明 pNNAT α 、pNNAT β 质粒构建成功,而且能成功将 NNAT α 、NNAT β 两种基因翻译成蛋白。

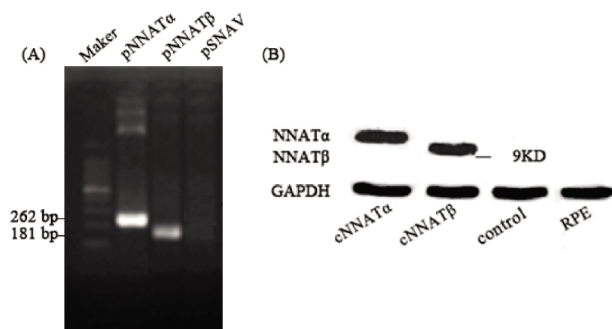


图 1 质粒的鉴定:(A)构建质粒的 PCR 扩增产物凝胶电泳成像;(B)四组 RPE 细胞的 Western Blotting 化学发光成像图片

Fig. 1 Identification of the constructed plasmids:(A) Electropherogram of PCR amplification products of the constructed plasmids;(B) Western Blotting analysis of NNAT expression in transfected RPE cell lines

2.2 稳定表达细胞株的鉴定

2.2.1 稳定表达细胞株的 Western-Blotting 鉴定 稳定表达细胞株的荧光对照组细胞在经过两轮筛选后,置于荧光显微镜下观察,视野内细胞中百分百表达绿色荧光蛋白,(图 2(B))。Western-Blotting 结果显示(图 2(A)),cNNAT α 细胞组,cNNAT β 细胞组均有对应的 NNAT 蛋白条带,control 组、cGFP 细胞组和 RPE 细胞组未检测到 NNAT 蛋白,与预计结果一样。

2.2.2 稳定表达细胞株 RT-PCR 的鉴定 RT-PCR 扩增产物琼

脂糖凝胶电泳图谱显示(图 2(C)),cNNAT α 条带大小在 200

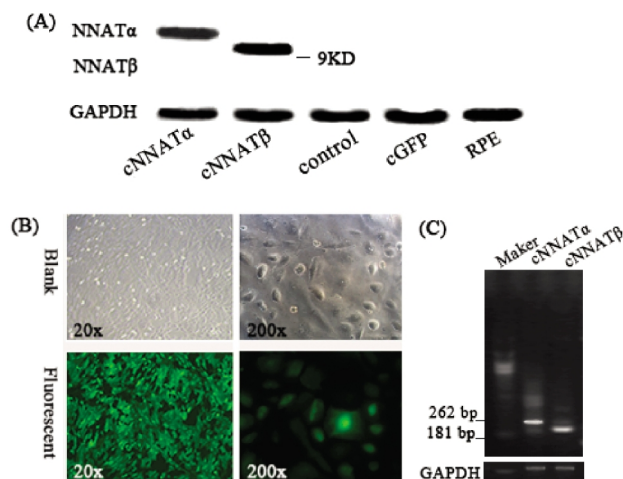


图 2 稳定表达细胞的鉴定:(A)五组 RPE 细胞的 Western Blotting 显影图片;(B)稳定表达细胞荧光对照图;(C)稳定表达细胞株 RT-PCR 扩增产物凝胶电泳成像

Fig. 2 Stable cell identification:(A) Western Blotting analysis of NNAT expression in stable transfected RPE cell lines;(B) fluorescence image of the stable transfected pGFP control cell line;(C) Electropherogram of PCR amplification products of stable transfected RPE cell lines

bp-300 bp 之间,cNNAT β 条带大小在接近 200 bp 处,与理论值大小相符(cNNAT α 为 262 bp,cNNAT β 为 181 bp),表明目的质粒的稳定表达细胞株构建成功。

2.3 细胞增殖实验

2.3.1 CCK-8 细胞增殖实验 CCK-8 的结果显示(图 3),cNNAT α 组与对照组相比较,NNAT α 有显著的增殖作用,增值率为 23.33 %($P<0.05$),cNNAT β 组相较于对照组无显著性差异。

2.3.2 流式细胞仪分析细胞周期 我们进一步用细胞流式仪分析 pNNAT α 、pNNAT β 和 pSNAV 稳定表达的 RPE 细胞株这三组细胞的细胞周期。流式细胞仪分析细胞周期结果显示(表 1),NNAT 对 RPE 细胞周期的影响主要在 S 期,cNNAT α 组和 cNNAT β 组细胞在 S 期的百分率分别为 11.56 %、5.01 %,对照组的为 4.23 %。

2.4 细胞迁移实验

从实验结果(图 4)以及划痕宽度数据的统计分析可以发现,在 18 h 时,cNNAT α 组的迁移能力高于对照组,在 36 h 时,

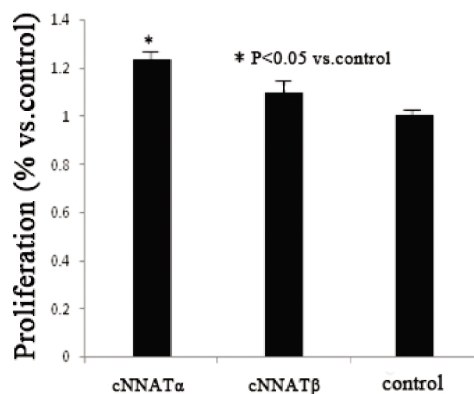


图 3 CCK-8 检测三组 RPE 细胞增殖能力的直方图

Fig. 3 CCK-8 analysis of three groups of stable transfected RPE cell lines

表 1 三组 RPE 细胞周期结果

Table 1 Results of the cell cycle for three groups of stable transfected RPE celllines

Name	cNNAT α	cNNAT β	control
G1 Phase	81.39 %	88.89 %	90.05 %
G2 Phase	7.04 %	6.10 %	5.71 %
S Phase	11.56 %	5.01 %	4.23 %
Total(G2-S Phase)	18.60 %	11.11 %	9.94 %

cNNAT α 组和 cNNAT β 组的迁移能力均高于对照组,并且 cNNAT α 组迁移能力也高于 cNNAT β 组的($P<0.05$)。

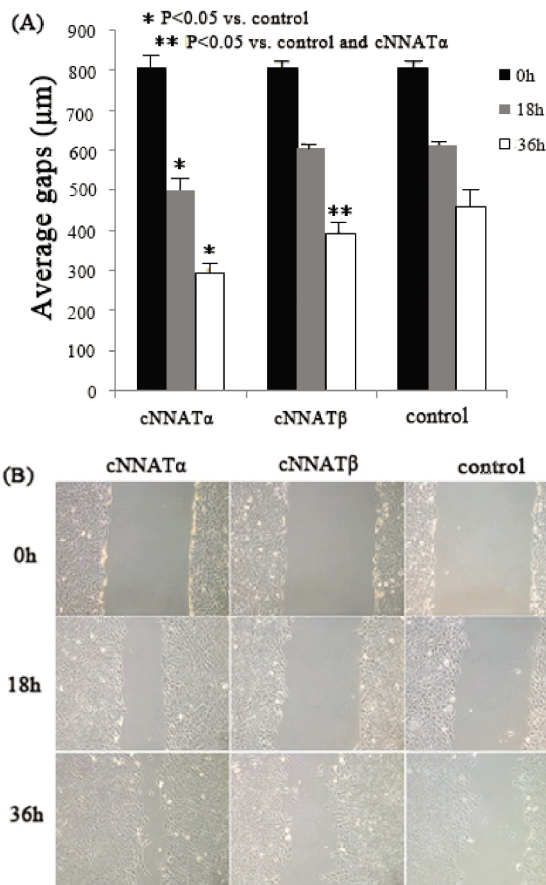


图 4 细胞划痕实验结果:(A)三组 RPE 细胞迁移能力统计分析(B)三组 RPE 细胞划痕实验图片

Fig. 4 Results of cell wound scratch assay: (A) Statistical analysis of cell migration ability for three groups of stable transfected RPE cell; (B) Photograph of cell wound scratch assay for three groups of stable transfected RPE celllines

3 讨论

我们课题组成功构建了 Nnat α 、 β 两种剪接形式的表达质粒,并获得了 Nnat α 和 Nnat β 稳定表达 PRE 细胞株,CCK-8 实验检测结果发现,与对照组相比,cNNAT α 组增值率为 23.33 %,有显著的增殖作用($P<0.05$),cNNAT β 组相较于对照组无显著性差异。进一步的细胞周期分析,cNNAT α 组,cNNAT β 组和对

照组细胞在 S 期的百分率分别为 11.56 %、5.01 %、4.23 %,因此我们总结得出 Nnat α 对 RPE 细胞增殖有显著的促进作用($P<0.05$),且主要影响在 S 期,Nnat β 对 RPE 细胞增殖无显著差异。本研究还发现了 Nnat 能显著促进 RPE 细胞的迁移能力。增殖性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreoretinopathy, PVR) 的诱导原因包括视网膜手术时冷凝、热凝、外伤、孔源性视网膜脱离及眼内炎症,RPE 细胞在增殖性玻璃体视网膜病变的发生和发展过程中起重要作用,被认为是 PVR 膜形成和收缩的最主要的细胞,它不仅是增殖膜形成和收缩的主要细胞,而且可产生趋化因子吸引纤维胶质细胞和成纤维细胞参与增殖膜的形[18]。我们的研究发现 Nnat 对 RPE 细胞增殖和迁移有显著的促进作用将有助于深入理解 PVR 的发生发展机理。

近些年,已有研究证明了 Nnat 参与了葡萄糖引起的胰岛素分泌的功能调节[10,11]。通过增强胞内钙水平而增强胰岛 β 细胞分泌胰岛素,而过表达时促进高糖血症引起的胰岛 β 细胞凋亡,且 Nnat 目前已作为干细胞分化为胰腺细胞的标志物[9],可见,其在糖尿病的发病机制中发挥一定的作用,而在糖尿病的重要并发症糖尿病视网膜病变中 Nnat 的两种亚型在 RPE 细胞以及其他相关细胞中是否发挥一定的作用,以及其作用的分子机制有待于进一步的研究。

我们发现 Nnat 对细胞增殖与迁移能力有一定的促进作用,但其作用的机制尚有待于深入研究,例如哪些信号分子参与了 NNAT 对 RPE 细胞的增殖与迁移尚不明确;此外 Nnat α 和 Nnat β 对 RPE 的影响作用有所差异,但这一差异的机制有待于深入研究,有研究报道 Nnat α 和 Nnat β 在细胞内以均一或者聚合体的形式存在[17],该结构的差异是否与影响作用的差异相关联尚需要进一步明确。

除了 RPE 细胞的增殖、迁移行为,其他诸如 RPE 细胞的转化、细胞外基质分泌、细胞的附着和收缩以及对细胞因子的刺激反应性增加等功能异常在 PVR 的发病机理中起着重要的作用[18],今后的研究可以拓展到其对 RPE 细胞更为广泛的生物学行为的影响,从而加深对 NNAT 功能的理解,为 PVR 的发生发展机理的研究打下一定的基础。

参考文献 (References)

- [1] Tani F, Kuroiwa Y, Wakana S, et al. Pe95/Neuronatin is an imprinted gene located on sub-distal chromosome 2 in the mouse [J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(17): 3428-3432
- [2] Joseph R, Dou D, Tsang W. Neuronatin mRNA: alternatively spliced forms of a novel brain-specific mammalian developmental gene [J]. Brain Res, 1995, 690: 92-98
- [3] Dugu L, Takahara M, Tsuji G. Abundant expression of neuronatin in normal eccrine, apocrine and sebaceous glands and their neoplasms [J]. Dermatol, 2010, 37(9): 846-848
- [4] Li Huiming, Wang Feng, Qiu Wei, et al. Expression patterns of the retinal development-related genes in the fetal and adult Retina [J]. Chinese Medical Journal, 2007, 120(19): 1716-1719
- [5] Lin HH, Bell E, Uwanogho D, et al. Neuronatin promotes neural lineage in ESCs via Ca²⁺ signaling [J]. Stem Cells, 2010,28(11): 1950-1960
- [6] Oyang EL, Davidson BC, Lee W, et al. Functional characterization of the dendritically localized mRNA Neuronatin in hippocampal neurons [J]. PLoS One, 2011, 6(9): e2479-e2479

(下转第 6245 页)

- [10] Zimering MB, Anderson RJ, Ge L, et al. Increased plasma basic fibroblast growth factor is associated with coronary heart disease in adult type 2 diabetes mellitus[J]. *Metabolism*, 2011,60(2):284-291
- [11] Frontini MJ, Nong Z, Gros R, et al. Fibroblast growth factor 9 delivery during angiogenesis produces durable, vasoresponsive microvessels wrapped by smooth muscle cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2011,29(5):421-427
- [12] Zhu S, Xue R, Zhao P, et al. Targeted disruption of the prostaglandin E2 E-prostanoid 2 receptor exacerbates vascular neointimal formation in mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011,31(8):1739-1747
- [13] Morris DR, Moxon JV, Biros E, et al. Meta-analysis of the association between transforming growth factor-beta polymorphisms and complications of coronary heart disease[J]. *PLoS One*, 2012,7(5): e37878
- [14] Skuli N, Majmundar AJ, Krock BL, et al. Endothelial HIF-2alpha regulates murine pathological angiogenesis and revascularization processes[J]. *J Clin Invest*, 2012,122(4):1427-1443
- [15] Hynes B, Kumar AH, O'Sullivan J, et al. Potent endothelial progenitor cell-conditioned media-related anti-apoptotic, cardioprotective, and pro-angiogenic effects post-myocardial infarction are mediated by insulin-like growth factor-1[J]. *Eur Heart J*, 2013,34(10): 782-789
- [16] Bir SC, Xiong Y, Kevil CG, et al. Emerging role of PKA/eNOS pathway in therapeutic angiogenesis for ischaemic tissue diseases[J]. *Cardiovasc Res*, 2012,95(1):7-18
- [17] Roy A, Kolattukudy PE. Monocyte chemotactic protein-induced protein (MCP-1) promotes inflammatory angiogenesis via sequential induction of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and autophagy[J]. *Cell Signal*, 2012,24(11):2123-2131
- [18] Yla-Herttuala S. Cardiovascular gene therapy with vascular endothelial growth factors[J]. *Gene*, 2013,525(2):217-219
- [19] 王永刚, 石益, 于远望, 等. 中药复方对冠心病治疗性血管新生的研究进展[J]. *陕西中医学院学报*, 2012,35(06):109-111
- Wang Yong-gang, Shi Yi, Yu Yuan-wang, et al. Traditional Chinese medicine compound for therapeutic angiogenesis research progress of coronary heart disease [J]. *Journal of Shanxi College of Traditional Chinese Medicine*, 2012,35(06):109-111
- [20] 段练, 熊兴江, 王阶. 冠心病的治疗性血管新生与活血化痰 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2013,33(11):1561-1566
- Duan Lian, Xiong Xing-jiang, Wang Jie. Activating blood circulation to remove stasis and therapeutic angiogenesis of coronary heart disease[J]. *CJITWM*, 2013,33(11):1561-1566

(上接第 6236 页)

- [7] Sharma J, Mukherjee D, Rao SN, et al. Neuronatin-mediated aberrant calcium signaling and endoplasmic reticulum stress underlie neuropathology in Lafora disease [J]. *Biol Chem*, 2013, 288 (13): 9482-9490
- [8] Chen KH, Yang CH, Cheng JT, et al. Altered Neuronatin expression in the rat dorsal root ganglion after sciatic nerve transection [J]. *Biomed Sci*, 2010, 28: 17-41
- [9] Nino Mzhavia, Shuiqing Yu, Shota Ikeda, et al. Neuronatin: A New Inflammation Gene Expressed on the Aortic Endothelium of Diabetic Mice [J]. *Diabetes*, 2008, 57: 2774-2783
- [10] Joe MK, Lee HJ, Suh YH, et al. A Crucial roles of Neuronatin in insulin secretion and high glucose-induced apoptosis in pancreatic β -cells [J]. *Cellular Signalling*, 2008, 20(5): 907-915
- [11] Khoi Chu, Ming-Jer Tsa. Neuronatin, a Down-stream Target of BETA2/NeuroD1 in the Pancreas, Is Involved in Glucose-Mediated Insulin Secretion [J]. *Diabetes*, 2005, 54: 1064-1073
- [12] Scott WR, Gelegen C, Chandarana K, et al. Differential pre-mRNA splicing regulates Nnat isoforms in the hypothalamus after gastric bypass surgery in mice [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e59407-e59407
- [13] Gburcik V, Cleasby ME, Timmons JA. Loss of neuronatin promotes "browning" of primary mouse adipocytes while reducing Glut1-mediated glucose disposal [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2013, 304(8): E885-894
- [14] Vrang N, Meyre D, Froguel P, et al. The imprinted gene Neuronatin is regulated by metabolic status and associated with obesity [J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2010, 18(7): 1289-1296
- [15] Dugu L, Nakahara T, Wu Z, et al. Neuronatin is related to keratinocyte differentiation by up-regulating involucrin [J]. *Dermatol Sci*, 2014, 73(3):225-231
- [16] Hubertus J, Zitzmann F, Trippel F, et al. Selective methylation of CpGs at regulatory binding sites controls NNAT expression in Wilms tumors [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e67605-e67605
- [17] Xu DS, Yang C, Proescholdt M, et al. Neuronatin in a subset of glioblastoma multiforme tumor progenitor cells is associated with increased cell proliferation and shorter patient survival [J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e37811-e37811
- [18] 何世坤, 赵明威, 陈有信. 视网膜色素上皮基础与临床 [M]. 北京: 科学出版社, 2005: 178-266
- He Shi-kun, Zhao Ming-wei, Chen You-xin. Basic and clinical in retinal pigment epithelium [M]. Bei Jing: Science Press, 2005: 178-266